

腹水肝癌 AH 7974 の腫瘍特異表面抗原の精製と性状について

金沢大学がん研究所病態生理部 (主任: 倉田自章教授)

竹 山 喜 盛

(昭和61年12月13日受付)

ラット腹水肝癌 AH7974 細胞の不溶分画をデオキシコール酸塩により可溶化し、得られた可溶性蛋白 (SP) 分画でモルモットを免疫してポリクローナルな抗血清を作製した。1 抗血清を選んで適当な吸収を加え、ゲル内拡散法、生細胞膜免疫蛍光法、ELISA 法によって AH7974 に特異な細胞表面抗原の存在を認めた。AH7974 の SP 分画から高速液体クロマトグラフィーによって腫瘍特異的な糖蛋白抗原が精製された。この抗原はアガロースゲル電気泳動で β_2 -泳動度を示し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では約 58,000 の分子量を示し、上皮細胞増殖因子 (EGF) を特異的に結合する能力があった。

Key words ascites hepatoma, tumor antigen, EGF receptor

腫瘍特異抗原 (tumor specific antigen, TSA) の研究は、化学発癌剤による動物癌に免疫生物学的機能として見いだされた tumor specific rejection antigen (TSRA) に始まる¹⁾²⁾。以後、そのような抗原をヒト腫瘍に求めた多数の免疫学的研究が、拒否という現象を離れて積み重ねられるようになった。腫瘍の特異的な免疫診断・治療には TSA の存在が前提条件となるからである。しかし、TSA の存在についてそれを暗示するデータは少ないが、まだ決定的な証拠が得られていないのは、TSA を精製して分子レベルあるいは遺伝子レベルで解析することの困難さにもあるであろう。

著者の属する教室ではヒト癌の TSA を求めた一連の研究がなされ、その有力候補となる抗原の同定・分離が行われつつあるが^{3)~6)}、動物癌 (化学発癌) についての研究はまだ行われていない。そこで著者はジメチルアミノアゾベンゼン肝癌由来のラット腹水肝癌を材料として選んだ。容易に大量の癌細胞を集め得る点で腹水癌はそのような目的には最適の材料だからである。腹水肝癌の中からとくに増殖が安定で扱いやすい AH7974 を選び、他の腹水肝癌を対照として、TSA と思われる抗原の精製とその性状についての研究を行った。

材料および方法

I. 材 料

腹水肝癌 AH7974 細胞の約 3×10^6 個を生理食塩水 1 ml に懸濁し、7~8 週令のドンリュウラットの腹腔内に接種した。接種後 7~10 日目の腹水を採取し、細胞を生理食塩水で 3 回洗浄し、最後の細胞沈渣を密封して使用時まで -20°C に保存した。なお、生細胞による実験が随時行えるように実験終了時まで 2, 3 の株はドンリュウラットで継代維持した。腹水肝癌細胞株はすべて佐々木研究所、佐藤 博先生より、御恵与戴いたものである。別に対照抗原作製のため、正常ドンリュウラットの各臓器および妊娠 15 日目後の胎仔を使用した。

II. 可溶性蛋白 (solubilized proteins, SP) の作製

凍結細胞を融解後、Kurata ら⁷⁾、Okada ら⁸⁾、関⁶⁾の方法に従って SP を作製した。融解細胞をテフロンホモジナイザーにより 0.16M 塩化カリウム、0.017M クエン酸ナトリウム、0.001M モノヨード酢酸溶液で氷冷下にホモジネートをつくり、10,000×g 30 分遠心する。沈渣を再度上液でホモジネートにし、遠心する。ついで、1M 塩化カリウム、0.034M クエン酸ナトリ

Abbreviations: ABC, avidin-biotin-peroxidase complex; BSA, bovine serum albumin; DSS, disuccinimidyl suberate; EGF, epidermal growth factor; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; HPLC, high performance liquid chromatography; LCMI, living cell

ウム, 0.001 M モノヨード酢酸溶液 (塩酸で pH 4.7 に補正) で沈渣をホモジネートにし, 遠心する操作を 8 回くり返す。最終沈渣に約 5 倍容量の 0.2% デオキシコール酸ナトリウム液を加え, 4°C で 48 時間攪拌後, 遠心する。沈渣に再度同様の操作を加え, 2 回の抽出液を合わせて約 10 倍容量の冷アセトンに加え, -20°C に 1 夜おく。生じた沈澱を集めて少量の蒸留水にとかし, セファローズ 4B (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) のカラムに負荷し, 蒸留水またはリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline pH 7.4, PBS) で溶出する。排除容量における小ピーク (痕跡的) は捨て, 遅れて出現する単一の低分子ピークを集める。4°C で 2 日の風乾によって適当に濃縮し, Lowry ら⁹⁾の方法または蛋白測定キット (Bio-Rad Laboratories, Richmond, U.S.A.) による色素結合法を用い, ウシγグロブリンを基準にして蛋白量を測定し, -20°C に保存する。この分画を 'SP' と呼ぶ。対照の腹水肝癌や正常臓器からも SP を作製したが, 臓器の場合には最初ホモジネートをガーゼ 1, 2, 4, 8 枚で順次吸引濾過したのち, つぎの段階へと進めた。

SP には血清蛋白とくにアルブミンの混在がかなり多いので, 約 10 mg 蛋白の SP 溶液を Blue Sepharose CL-6B[®] (Pharmacia) のカラム (1.5×10 cm) に通してアルブミンを除去した。その条件は Pharmacia の指定に従った。この分画を以後 'SPbs' と呼ぶ。AH7974 では湿量約 5 g の細胞沈渣から約 50 mg 蛋白の SP が得られ, SPbs として約 20 mg 蛋白が得られている。

III. ポリクローナル抗体の作製

AH7974 の SP 0.5 ml (5 mg 蛋白) を等量の完全フロイントアジュバントで乳化し, 体重約 400 g のモルモットの肩甲骨下腔に分割注射した。7, 14, 21, 35 日目に同様の注射を追加し, 42 日目に心採血を行った。得られた抗血清は少量ずつにわけ -20°C に保存し, 凍結解融のくり返しは避けた。同時に 3 匹のモルモットを免疫し, 最も高単位の 1 抗血清を選び, 全実験に使用した。

ゲル内拡散法には, 抗 AH7974 抗血清 1 ml あたり肝, 腎, 脾 AH108, AH127 の各 SP 10 mg 蛋白を加え, 室温 1 時間放置後, 4°C で 1 夜低速回転させ, 遠心上清を 1 ml に濃縮して使用した。

免疫蛍光用には以下のような吸収を行った。正常肝,

腎, 脾, 肺, 心, 胎仔の 25% (W/V) 生理食塩水ホモジネート各 1 ml に血清 4 ml を加えて均一なホモジネートをつくり, Ternynck ら¹⁰⁾に従って, グルタルアルデヒドにより pH 5 で不溶化した。微粒子化・洗浄・エタノールアミンによるブロッキング・洗浄を行ってから, 抗 AH7974 抗血清 1 ml を加え, 室温 1 時間後 4°C 1 夜の低速回転を行った。遠心上清をとり同様の吸収操作をさらに 2 回行った。なお, 腹水肝癌細胞による吸収をさらに加える場合には, 上記吸収抗血清 100 μ l に細胞沈渣 100 μ l を加え, 37°C 1 時間の吸収を行った。

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) および免疫沈降用には, 抗 AH7974 抗血清 20 μ l あたり, 血清 12 ml, 肝ホモジネート 15 ml, 脾, 腎, 肺のホモジネート各 4 ml, 胎仔ホモジネート 10 ml を加え, 室温 1 時間放置ついで 4°C 1 夜回転した。10,000 G 30 分遠心して上清をとり, 0.2 M 酢酸緩衝液 pH 5.0 を等量加え, 4°C 1 時間攪拌した。10,000 G 20 分遠心の上清を硫酸アンモニウム 1/3 飽和にして沈澱をとり, PBS 10 ml にとかし, PBS に対して 1 夜 4°C で透析してから液量を一定に補正し, 窒化ナトリウムを 0.05% に加え 4°C に保存した。吸収用ホモジネートはこの場合もすべて 25% (W/V) である。

IV. 分析方法

1. ゲル内拡散法

ゲル内二重拡散法には, 厚さ 1.5~2.0 mm のアガロース層に直径 3 mm, 間隔 4 mm のウェルをあけ, 抗原は SP 3 mg 蛋白/ml, 吸収抗血清は稀釈せずに使用した。湿潤状態で 4°C におき 1 週間観察した。なお, 免疫電気泳動にはアガロース HE (FMC Corporation, Marine Colloids Inc., Rockland, U.S.A.) ゲルを用い, SP を 20 mA で 2 時間泳動後, 吸収抗血清と反応させた。

2. 免疫蛍光法

Living cell membrane immunofluorescence (LCMI) を間接法で行った。腹水細胞を PBS で 3 回洗浄し, 約 2.5×10^5 個を含む 50 μ l に吸収抗血清 (PBS による 6 倍稀釈) 100 μ l を加え, 0°C で 1 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄後, 抗モルモット IgG ウサギ抗血清 (MBL Co. Ltd., 名古屋) の 3 倍稀釈液 100 μ l を加え 0°C 30 分反応させ, 洗浄後グリセリン-PBS で封入し, Olympus 落射蛍光顕微鏡 BH-RFL-B で検鏡した。なお, 操作中細胞の温度を 0~4°C に保つよう

membrane immunofluorescence; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PBS, phosphate-buffered saline; SDS, sodium dodecyl sulfate; SP, solubilized proteins; TSA, tumor specific antigen; TSRA, tumor specific rejection antigen.

に留意した。

3. ELISA

96 孔のビニール測定プレート (Costar, Cambridge, U.S.A.) を用い、既報の術式⁶⁾に従った。抗原材料はウェルあたり 50 または 100 μ l とし、吸収抗血清は原血清の 500 倍希釈を用いた。

4. 高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography, HPLC)

ポンプはモデル 302, マノメトリックモジュールはモデル 802, ディテクターはモデル 111 (以上, Gilson, France), レコーダーにはモデル 1202 (Linea Instruments Corporation, U.S.A.) を使用した。TSK ガードカラム SW および TSK gel[®] G3000 SW (以上, 東洋曹達, 東京) を付置し, SPbs 液 300 μ l (600 μ g 蛋白以下) を負荷した。0.05 M リン酸緩衝液 pH 7.8 を用い、流速 1.0 ml/分で溶出し 1 ml づつ分取した。溶出パターンは波長 280 nm, レンジ 0.05, チャートスピード 30 cm/時で記録した。溶出液 100 μ l について ELISA を行った。

5. 免疫沈降法

Brown¹⁰⁾の方法によった。AH7974 の HPLC による精製抗原分画 500 μ l (15 μ g 倍蛋白) に ¹²⁵I Na 50 μ l (500 μ iCi, Amersham International plc, Buckinghamshire, England) と 0.25% クロラミン T 液 10 μ l を加えて室温 20 秒おき、0.25% ピロ亜硫酸ナトリウム 5 μ l, 0.5% BSA-PBS 435 μ l を加えてセファディックス G-25 カラム (PD-10, Pharmacia) を通し、排除容量の標識抗原分画を分離した。この分画 100 μ l に吸収抗 AH7974 IgG (原血清量の 500 倍に溶解) 400 μ l を加えて 4°C 30 分おき、つぎに抗モルモット IgG ヤギ抗血清 (Cappel Laboratories, U.S.A.) 160 μ l を加えて 4°C 30 分おいた。遠心沈渣をとり、100 μ l の免疫沈降用緩衝液と Protein A-Sepharose beads (pharmacia) の 50% (W/V) 懸濁液 50 μ l を加えて 4°C 30 分おいた。遠心沈渣をとり、十分な洗浄を行い、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) をメルカプトエタノール存在下に行い、オートラジオグラフィーを実施した。

6. SDS-PAGE, オートラジオグラフィー, Western blotting

SDS-PAGE は Laemmli¹¹⁾の方法によった。試料にメルカプトエタノールを含むサンプル緩衝液を加え、100°C 5 分加熱後、ミニスラブディスク電気泳動を行った。分離ゲルは 10% ポリアクリルアミドゲルとし、2.2 mA/cm の定電流で 75 分泳動を行った。チトクローム系列の分子量マーカー蛋白 (オリエンタル酵

母, 東京) を同時に泳動した。染色にはコマジー青あるいは Silver stain[®] (Bio-Rad) を使用した。

染色ゲルは乾燥し、intensifying screens (X-Omatic Regular, Eastman Kodak Co., New York, U.S.A.) と Kodak XAR-2 フィルムを用い、-70°C で 3~5 日間の露出を行った。

Western blotting は Burnette¹²⁾の方法に従った。転写膜には Durapore filter[®] (Milipore Corp., Bedford, U.S.A.) を用い、染色を吸収抗 AH7974 抗血清を用いた avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) 法で行った⁶⁾。

7. ゾーン電気泳動 (Zone electrophoresis)

アガロース HE (FMC) を用い、AH7974 の SPbs 100 μ g 蛋白を閾⁶⁾のごとくに泳動、切出し、抽出、ELISA を行った。

8. レクチンゲル・クロマトグラフィー

レクチンゲル・キット I (E・Y Laboratories Inc., San Mateo, U.S.A.) を用い、各カラム (1.5×1.5 cm) に AH7974 の SP 1 ml (約 100 μ g 蛋白) を負荷した。0.01 M PBS pH 7.4 または 0.15 M 塩化ナトリウム・0.02 M トリス-塩酸緩衝液 pH 7.4, 10 ml で溶出後、同緩衝液にそれぞれの糖を 0.05~0.2 M に加えた液 10 ml で溶出した。溶出液は 1 ml づつ分取し、抗原量を ELISA で測定した。

9. 酵素分解試験

AH7974 の HPLC 精製分画を ELISA 用プレート各ウェルに 50 μ l (100 μ g 蛋白) 加え、37°C 1 時間後にウェルを 3 回洗浄し、10 μ g/ml の酵素溶液 50 μ l を加え、37°C 2 時間おいて洗浄し、ELISA を行った。用いた酵素と溶媒は (1) トリプシン (Type III, Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.), 0.05 M トリス-塩酸緩衝液 pH 7.5, (2) プロナーゼ E (科研化学, 東京), 0.05 M トリス-塩酸緩衝液 pH 7.5, (3) ペプシン (1:10,000 Bacto, Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.), 0.2 M 塩酸-塩化カリウム緩衝液 pH 1.9, (4) フォスフォリパーゼ D (Type III, Sigma), 0.05 M リン酸塩緩衝液 pH 7.4, (5) Snake venom (Agkistrodon halys, 武田製薬研究所より御恵与), 0.05 M リン酸塩緩衝液 pH 7.4, (6) ノイラミニダーゼ (Type V, Sigma), 0.1 M クエン酸-リン酸塩緩衝液 pH 5.3, である。対照は 0.05 M リン酸塩緩衝液 pH 7.4 を加えた。

10. 上皮細胞増殖因子 (Epidermal growth factor, EGF) 受容体活性

AH7974 の SP 溶液 100 μ l (5 mg 蛋白) に ヒト EGF (湧永製薬, 大阪) 1 μ g の存在下または不在下, ¹²⁵I-EGF 10 μ l (0.5 μ iCi, Amersham) を加え、24°C 30

分おき、直ちにサンプル緩衝液を加えて 100°C 5 分加熱して SDS-PAGE を行い、染色・乾燥後にオートラジオグラフィーを行った。生細胞を使用する場合には、PBS で洗浄した細胞沈渣 (1.5×10^5 個) について同様に ^{125}I -EGF を加え、37°C 60 分おいてから PBS で 3 回洗浄し、10 μl の 0.1 M disuccinimidyl suberate (DSS)-ジメチルサルフォキシド¹³⁾を加えて 37°C 30 分おき、以後の処理を同様に行った。

成 績

I. ゲル内拡散法

AH7974 および対照材料の SP と吸収抗 AH7974 抗血清とで予備的にゲル内二重拡散法を行ってみると、AH7974 の SP は正常組織や他の腹水肝癌のそれには出現しない 1 沈降線を生じた (図 1)。しかし同時に非特異的な共通沈降線も出現し、特異沈降線のみを生じような抗血清を得るにはさらに吸収条件を検討する必要が示された。なお、上記特異沈降線は免疫電気泳動では β_2 -泳動度のアークとなって出現した。

II. LCMI

吸収抗 AH7974 抗血清による LCMI では、すべての AH7974 細胞がリング状膜染色を起こした (図 2, a)。このリング状染色は細胞を 37°C にすると直ちに例外なくパッチ形式を起こし (図 2, b)。1 時間を越える頃からインターナリゼーションや帽子形式 (図 2, c) を起こす細胞が見られたが、その数は多くなかった。対照の AH13 (図 2, d), AH41c, AH44 (図 2, e), AH66, AH127, AH130 (図 2, f) はすべて陰性であった。抗血清の吸収が不十分な場合に AH13 細胞が微弱陽性反応を示すことがあったが、その場合には抗血清を AH13 細胞で短時間吸収すると容易に AH13 細胞は陰性化し、AH7974 細胞の染色は変らなかった。なお、抗 AH13 および抗 AH127 抗血清は基本吸収後、AH7974 細胞を全く染めなかった。

III. ELISA

AH7974 および対照の腹水肝細胞や正常組織の SPbs についての ELISA による濃度-反応曲線を図 3 に示す。AH7974 の SPbs は量の増加につれて吸光値 (490 nm) の強い立上りを示したのに対し、他の腹水肝癌や正常組織のそれはほとんど無視できる程度であった。そこで、以後の抗原測定は ELISA で行うこととし、免疫沈降や ABC 染色にも ELISA 用吸収を行った抗 AH7974 抗血清を使用した。

IV. 抗原の精製

AH7974 の SPbs について HPLC を行い、図 4 の溶出曲線を得た。36 分目の溶出液をとり、再度 HPLC かけると、テーリングのないシャープな単一ピークが

得られた。このピークは SDS-PAGE を行っても銀染色またはコマジー青染色をやると単一バンドを示し、Western blotting を行い、吸収抗 AH7974 抗血清 (原血清の 500 倍稀釈) を 1 次抗体として ABC 染色を行うと、転写された同バンドが陽性染色を示した。

V. 抗原の化学的性状

AH7974 の HPLC による精製分画を ^{125}I でラベルし、吸収抗 AH7974 抗血清による免疫沈降法を行ってみると、SDS-PAGE とオートラジオグラフィーで分子量 58,000 (58 Kd) のバンドが認められた (図 5, A)。他にはラベルされたバンドは出現しなかった。

AH7974 の SPbs をアガロースゲルによるゾーン電気泳動にかけ、ゲルを切出して抽出し、ELISA を行った結果、図 6 のようなパターンを得た。 β_2 -泳動域に最も高い抗原活性ピークが見られる。これは免疫電気泳動の成績にも一致する。

レクチンゲルによるアフィニティクロマトグラフィーでは、抗原はコンカナバリン A-ゲルとの結合を示し、メチル- α -D-マンノピラノシドにより遊離した (図 6, A)。UEA-I ゲルには結合せず (図 6, B), DAB, WGA, RCA-I の各ゲルにも有意なほどの結合を示さなかった。

精製抗原の酵素分解試験を行ってみると、蛋白分解酵素により抗原活性が低下した。トリプシンでは 98%、ペプシンとプロナーゼ処理では約 60% の活性消失が見られた。蛇毒、フォスフォリパーゼ D、ノイラミニダーゼ処理では活性低下は起こらなかった。

抗原の Western blotting で生じた 58 Kd のバンドは、上述のように吸収抗 AH7974 抗血清による ABC

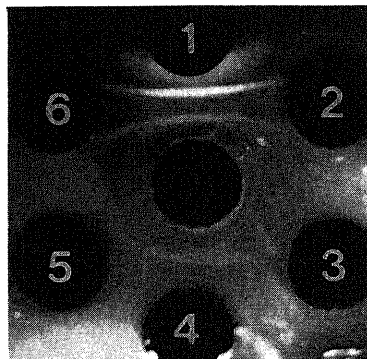


Fig. 1. Examples of immunodiffusion patterns of absorbed antiserum to the solubilized protein (SP) fraction of ascites hepatoma AH7974 cells (anti-AH7974 antiserum) in the center well against SP fractions from various control materials in the peripheral wells. 1, AH7974; 2, AH108; 3, kidney; 4, spleen; 5, liver; 6, AH127.

染色で陽性に染まるが、転写膜を EGF 溶液 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) に 37°C 30 分インキュベートしてから染色すると、同バンドの染色が阻害された。インシュリン溶液 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) にインキュベートしてもこのような染色阻害は起こらなかった。このことは 58 K バンドに EGF 結

合活性があることを暗示するので、以下の実験を行った。AH7974 の SP を ^{125}I -EGF とインキュベートした後、SDS-PAGE とオートラジオグラフィーを行った。結果は、64 Kd の強い放射性バンドのみを認めた (図 8, A)。大過剰の非標識 EGF の存在下で ^{125}I -EGF を

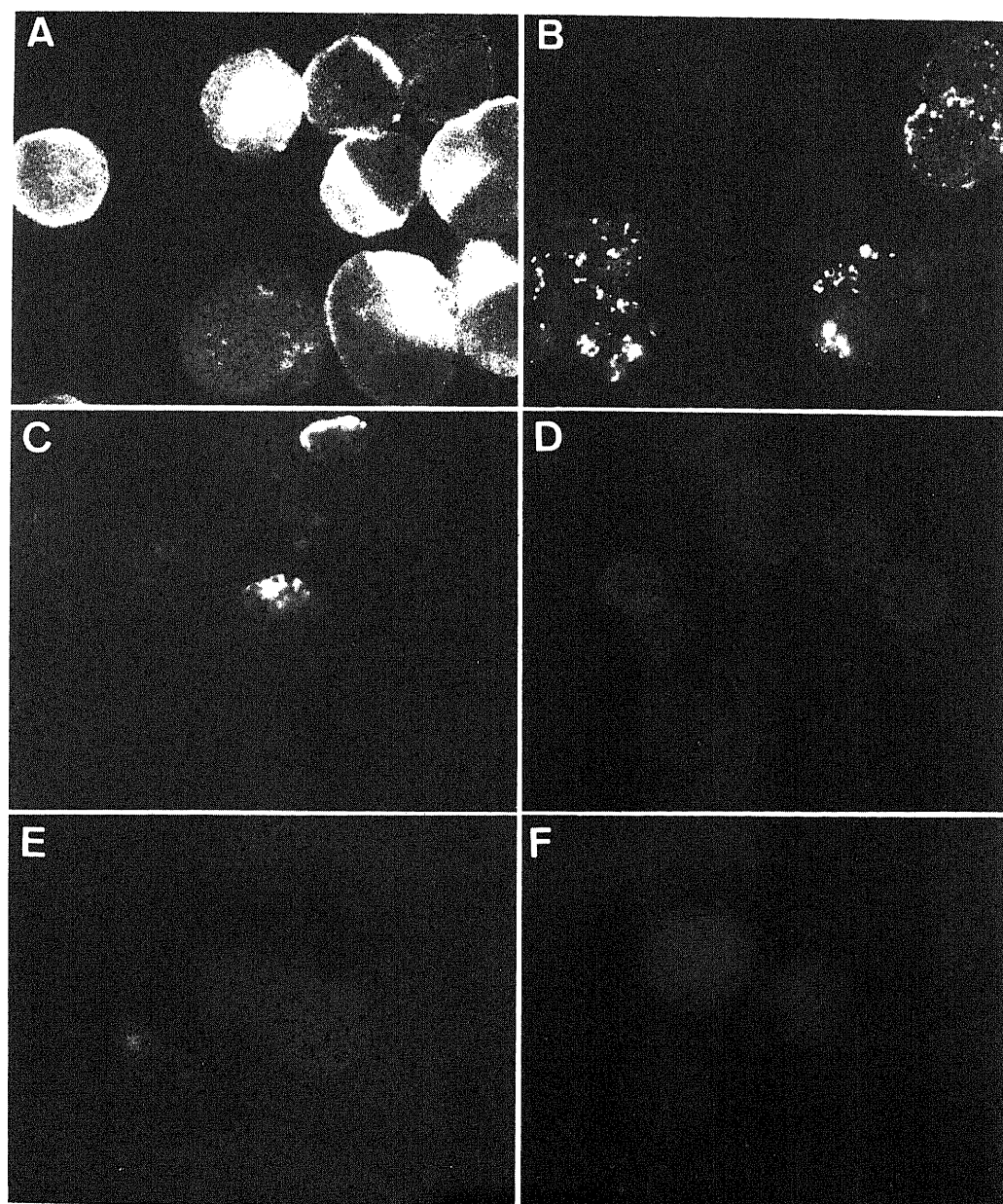


Fig. 2. Living cell membrane immunofluorescence with absorbed anti-AH7974 antiserum. A, AH7974 cells, uniform staining (smooth ring); B, AH7974 cells, patchy pattern; C, AH7974 cells, capping and internalization; D, AH13 cells, negative; E, AH44 cells, negative; F, AH130 cells, negative.

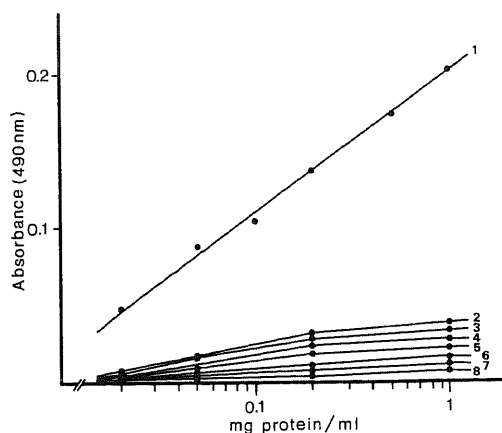


Fig. 3. Dose-response curves of SP fractions from AH7974 and control materials obtained by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with absorbed anti-AH7974 antiserum. 1, AH7974; 2, liver; 3, AH13; 4, kidney; 5, AH127; 6, spleen; 7, testis, 8, thymus.

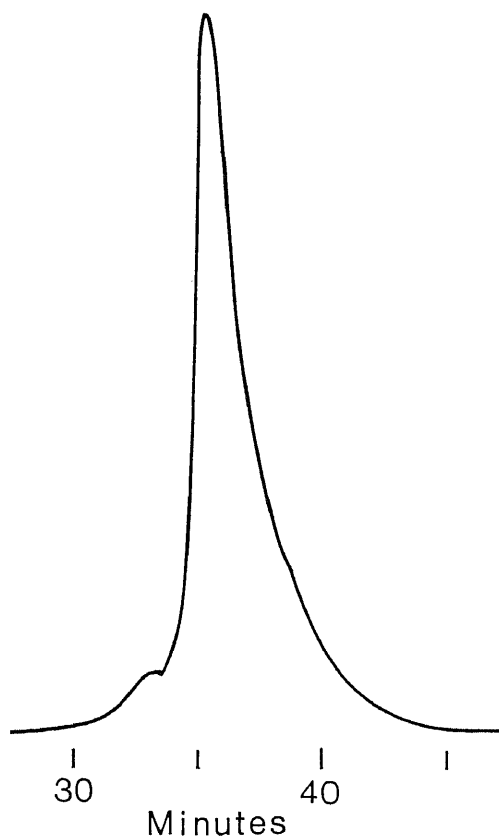


Fig. 4. Protein elution profiles (O. D. 280 nm) after high performance liquid chromatography with a TSK gel G3000 SW column of the SP fraction of AH7974 cells.

反応させた場合にはこのバンドはほとんど出現しない (図 8, B). 抗原と ^{125}I -EGF との反応後、架橋剤を作用させても結果はほとんど変わらない. 64 Kd のバンドは 58 Kd の抗原分子と EGF (6 Kd) が共有結合を起こしたことによると考えられるが, 58 Kd の抗原分子が精製過程でより大きな分子の分解によって生じた可能性は残る. そこで, AH7974 の生細胞を ^{125}I -EGF と反応させた. この場合, 反応後に架橋剤を使用して 64 Kd のバンドの出現を弱いながら認め得た (図 8, C).

考 察

ラットの腹水肝癌 AH7974 の不溶蛋白分画から作製した SP 分画には, 腫瘍特異と思われる細胞膜抗原の存在することが, ポリクローナル抗体を使用した免疫学的方法で示される. この抗原といわれる TSRA との関係は不明であるが, 他の腹水肝癌に認められないから, 化学発癌における個体特異性腫瘍抗原に一致するであろう. 抗原は β_2 -泳動度を示し, 分子量は約 58,000 で, コンカナバリン A との結合性からマンノースやグルコースを末端にもつ糖分子を結合している糖蛋白と考えられる. しかし, 蛋白分解酵素処理で抗原活性が容易に損われるから, 抗原特異性は抗原の蛋白部分にあるであろう. とくに興味深いことは, この 58 K の糖蛋白に EGF 受容体活性があることである. ^{125}I -EGF (分子量約 6 Kd) とインキュベートすると特異的な結合を起こして 64 Kd の分子を生じる. 既

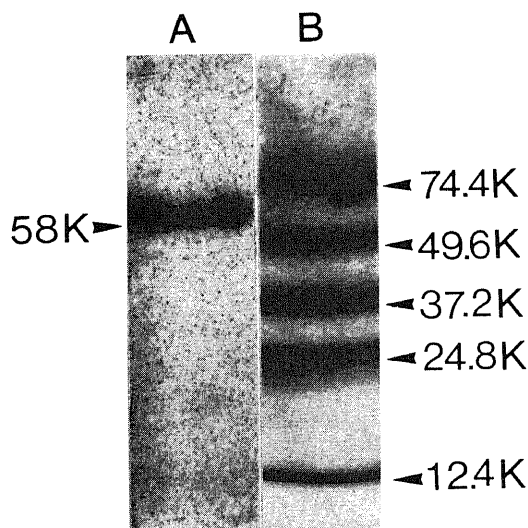


Fig. 5. Autoradiograph of an SDS-gel (10%) of immunoprecipitates from the ^{125}I -labelled SP fraction of AH7974 cells. A, the ^{125}I -labelled SP fraction + absorbed anti-AH7974 antiserum; B, molecular weight standards.

知の分子量約 170 Kd の EGF 受容体¹⁴⁾¹⁵⁾の場合と同様に、SDS-PAGE で EGF を分離しないから、共有結合による直接結合を起こすらしい。このような 58 Kd の EGF 受容体蛋白がより高分子なその分解産物である可能性が否定できないので¹⁶⁾¹⁷⁾、生細胞による ¹²⁵I-EGF 結合実験を行い、やはり 64 Kd の分子の出現することを認めた。TSA と EGF 受容体蛋白とが、一諸に精製される可能性についてはまだ完全に否定はできないが、最近、教室の岡田らがヒト腎細胞癌に 68 Kd、ウィルムス腫瘍に 58 Kd の TSA の存在を認め、精製後いずれにも EGF 結合活性と自己リン酸化活性のあることを認めている (未発表)。もしこれらが正しければ、従来知られている腫瘍特異性のない EGF 受容体とは別に、より低分子な腫瘍特異性 EGF 受容体がヒトおよび動物腫瘍に広く存在する可能性が生まれる。それらは当然腫瘍発生に関連する意義は大きいであろう。このような分子の細胞内機能や遺伝子背景などがつぎの重要な課題であろう。

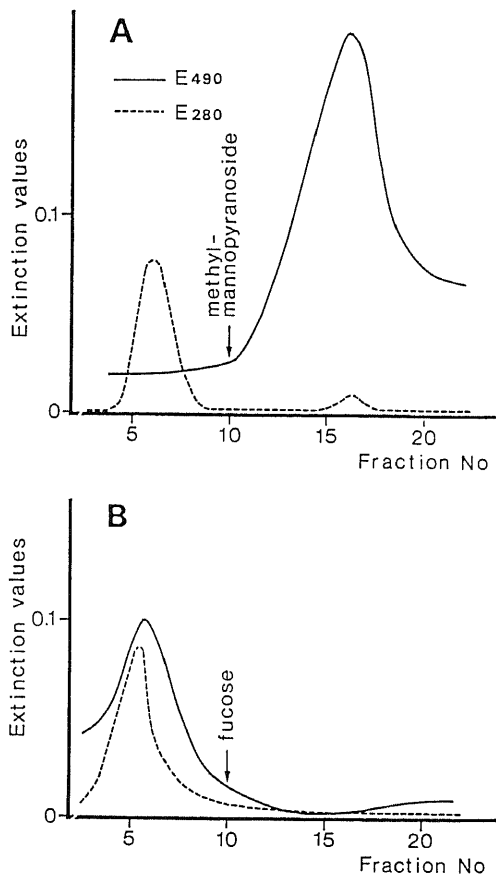


Fig. 6. Affinity chromatography of the SP fraction of AH7974 cells on lectin-gels. A, Con A-sepharose; B, UEA-I-sepharose.

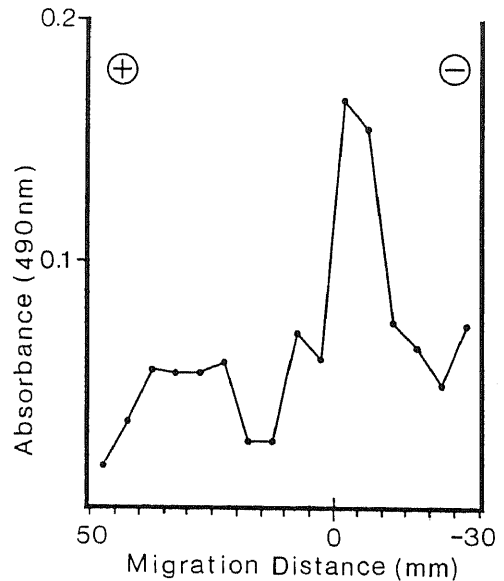


Fig. 7. Analysis by zone electrophoresis in agarose gel of the SP fraction from AH7974 cells. The gel was cut off at intervals of 5 mm, and the antigenic activity of the extract from each slice was assayed by ELISA with absorbed anti-AH7974 antiserum.

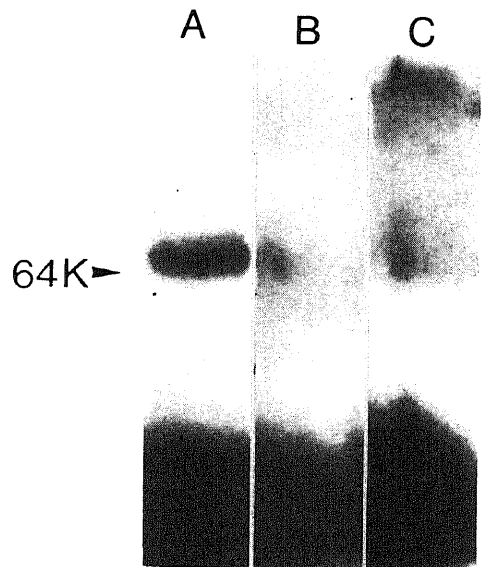


Fig. 8. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and autoradiography of the SP fraction of AH7974 cells incubated with ¹²⁵I-EGF in the absence (A) or presence (B) of excess unlabelled EGF. Column C represents the analysis of living AH7974 cells that were affinity-labelled with ¹²⁵I-EGF and treated with crosslinker.

結 論

ラット腹水肝癌 AH7974 細胞から不溶分画を抽出し、デオキシコール酸塩処理により可溶化した solubilized proteins (SP) を免疫原としてポリクローナル抗血清を作製した。抗血清を選び、適当な吸収を加えたのち、ゲル内拡散法、免疫蛍光法、ELISA などによる抗原分析と抗原の精製を行った。

1. ゲル内二重拡散法で AH7974 SP に特異な沈降線の生成を認めた。生細胞膜免疫蛍光法で AH7974 細胞の細胞膜に抗原の局在を認めたが、対照の各腹水肝癌細胞には同抗原は認められなかった。ELISA でも AH7974 SP (アルブミン除去後) 分画に高活性を認めたが、対照組織・細胞のそれは低値を示した。

2. AH7974 特異な抗原を SP 分画からゲル濾過型の HPLC により精製した。精製分画は SDS-PAGE や免疫沈降法で均質であり、分子量 58,000 の単一成分の存在を示した。

3. 抗原は β_2 -泳動度を示し、コンカナバリン A と結合性のある糖蛋白であるが、ポリクローナル抗体が認識する抗原活性は蛋白部分にあった。

4. 抗原には EGF 受容体活性があった。 ^{125}I -EGF と共有結合を生じ、64 Kd の分子を生じた。AH7974 の生細胞を用いた ^{125}I -EGF の結合実験でも 64 Kd の分子の生成が認められた。

謝 辞

終りに、御指導と御校閲を戴いた倉田自章教授、御指導と御援助を戴いた岡田助教授に心から感謝いたします。また、腹水肝癌細胞株を御恵与下さった佐々木研、佐藤 博先生に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Baldwin, R. W.: Immunological aspects of chemical carcinosis. *Adv. Cancer Res.*, 18, 1-75 (1973).
- 2) Chandrasa, K.: The development of specific suppression of conomitant immunity in two syngeneic tumor-host systems. *Int. J. Cancer*, 11, 648-662 (1973).
- 3) Okada, S., Itaya, K. & Kurata, Y.: Identification of a tumorspecific antigen in the insoluble fraction of human nephroblastoma. *Eur. J. Cancer*, 15, 1085-1093 (1979).
- 4) Yamada, T., Iwa, T., Kurata, Y. & Okada, S.: Extraction and preliminary characterization of tumor antigens in human bronchogenic adeno-

carcinoma and squamous cell carcinoma. *Eur. J. Cancer*, 16, 781-792 (1980).

- 5) Okada, S., Kurata, Y., Kitagawa, K. & Ookawa, M.: Demonstration and preliminary characterization of an antigen in the insoluble extracts of human transitional cell carcinoma. *Eur. J. Cancer*, 15, 1085-1093 (1980).
- 6) 関 誠: ヒト胃腺癌に高度に関連する抗原の異種抗血清による分析。十全医会誌, 95, 19-27 (1986).
- 7) Kurata, Y., Watanabe, Y., Okada, Y. & Fukuyama, Y.: Immunological studies of insoluble lipoproteins. II. On the salivary gland characteristic antigens. *Int. Arch. Allergy*, 35, 392-401 (1969).
- 8) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).
- 9) Ternynck, T. & Avrameas, S.: Polymerization and immobilization of proteins using ethylchloroformate and glutaraldehyde. *Scand. J. Immunol. Suppl.* 3, 29-35 (1976).
- 10) Brown, J. M.: Detection of a human sarcoma-associated antigen with monoclonal antibodies. *Cancer Res.*, 43, 2113-2120 (1983).
- 11) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685 (1970).
- 12) Burnette, W. N.: "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated Protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195-203 (1981).
- 13) Pilch, P. F. & Czech, M. P.: Interaction of cross-linking agents with the insulin effector system of isolated fat cells. *J. Biol. Chem.*, 254, 3375-3381 (1979).
- 14) Adamson, E. D. & Rees, A. R.: Epidermal growth factor receptors. *Mol. Cell. Biochem.*, 34, 129-152 (1981).
- 15) Cohen, S., Ushiro, H., Stoscheck, C. & Chinkers, M.: A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. *J. Biol. Chem.*, 15, 1523-1531 (1982).
- 16) Baker, J. B., Simmer, R. L., Glenn, K. C. & Cunningham, D. D.: Thrombin and epidermal

growth factor become linked to cell surface receptors during mitogenic stimulation. *Nature*, **278**, 743-745 (1979).

Purification and Characterization of a Tumor-Specific Surface Antigen in Murine Ascites Hepatoma AH7974 Kimori Takeyama, Department of Pathophysiology, Cancer Research Institute, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med. Soc., **96**, 71—79 (1987)

Key words : ascites hepatoma, EGF receptor, tumor antigen

Abstract

The insoluble extract of rat ascites hepatoma AH7974 cells was solubilized by the aid of deoxycholate and the solubilized proteins (SP) were used to raise polyclonal antisera in guinea pigs. A selected antiserum, after suitable absorptions, was proved to detect a surface antigen specific to AH7974 by immunodiffusion, living cell membrane immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay. A tumor-specific glycoprotein antigen was purified from the SP of AH7974 by high performance liquid chromatography. The antigen was shown to have β_2 -mobilities in zone electrophoresis in agarose gel and an apparent mol.wt. of 58,000 D in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and was able to bind specifically epidermal growth factor.